

令和5年度 理数科 玉島サイエンス探究Ⅰ 探究ゼミ（8授業時間1ユニット）

令和5年度実施  
生物探究ゼミ  
ワークシート

## 生物探究ゼミ① 培養の基礎(1)

### 【目的】

- ・培養の一般的技術を身につける。
- ・今回はマイクロピペットと血球計算盤の使い方、培地の調製などの基本を理解する。

### 【準備】

マイクロピペット、チップ、マイクロチューブ、血球計算盤、光学顕微鏡一式、エタノール、乾燥酵母等

### 【方法、結果】

#### 1. マイクロピペットの使い方

- (1) 計量する容量にあわせてマイクロピペットとチップを選ぶ。
- (2) ダイアルを回して、いったん計量する容量より多めの数字に合わせ、ゆっくりとダイアルを戻して、計量する量にあわせる。
- (3) マイクロピペットは利き手でしっかり握りこむように持ち、親指でプッシュロッドを操作する。
- (4) チップをマイクロピペットに装着する。
- (5) プッシュロッドを第1ストップまで押した状態で、チップの先端を液面につける。
- (6) ゆっくりプッシュロッドを押さえていた指を離し、液体を吸い上げる。
- (7) 測り取る容器に移動し、ゆっくりと第1ストップまで押し、液を排出し、さらに第2ストップまでプッシュロッドを押し下げて、チップ内の液を完全に排出する。
- (8) チップ回収ボックスの中で、チップイジェクターボタンを押して、チップをはずす。

#### 2. 希釈方法

- (1) 酵母菌懸濁液をマイクロピペットで  $100\mu\text{L}$  計り取り、マイクロチューブ①に入れる。
- (2) 次に、このマイクロチューブ①に水  $900\mu\text{L}$  を入れ、元の10倍希釈をつくる。
- (3) (2)のマイクロチューブ①をよく攪拌し、 $100\mu\text{L}$  を計り取り、別のマイクロチューブ②に入れる。このマイクロチューブ②に水  $900\mu\text{L}$  を入れ、元の100倍希釈をつくる。

#### 3. 血球計算盤の使い方

血球計算盤は、赤血球・白血球をはじめ、精子・酵母・細菌類など微小なものの数を簡単に計測することができる。

- (1) 血球計算盤の表面とカバーガラスをエタノールで拭く。
- (2) エタノールの乾かないうちに、血球計算盤にカバーガラスをのせ、ニュートンリングを確認する。  
\*ニュートンリング：表面が同率曲線のガラスを重ね合わせると出る虹色の縞模様。
- (3) 2で希釈した懸濁液(マイクロチューブ①か②)を攪拌して、酵母菌分布を均一にする。
- (4) その懸濁液をピペットに少量とり、血球計算盤とカバーガラスの間にそっと流し込む。
- (5) 光学顕微鏡(接眼レンズ10倍、対物レンズ10倍)を使い、酵母菌の数を大ブロック1つ( $4\times 4=16$ マ)分の中から4か所①~④を数える。
- (6) 懸濁液  $1\mu\text{L}$  ( $1\text{mm}^3$ ) あたりの酵母菌数を求める。

1  $\mu\text{L}$  ( $1\text{mm}^3$ ) あたりの酵母菌数

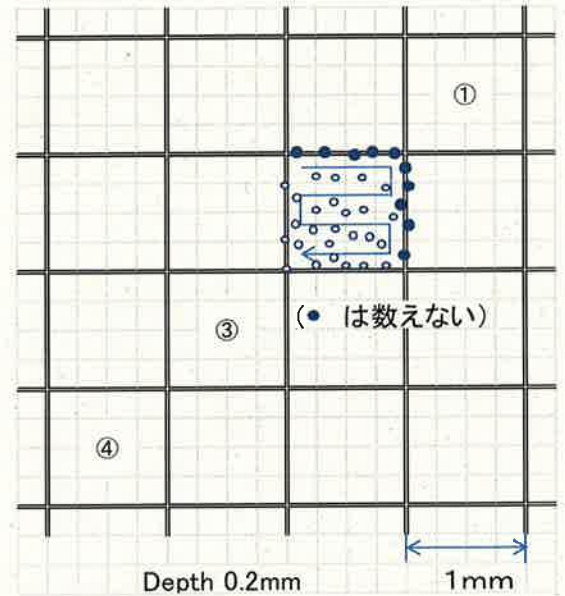
$$= \frac{\text{(5) の 4 か所の合計}}{4} \times 5 \times \text{希釈倍率}$$

数え方

①～④ の4か所を数える (下図)

計算

答え( )



【次回の準備：培地の調製】

- (1) 電子ばかりで**寒天培地**4. 7 gを計り、三角フラスコに入れる。
- (2) メスシリンダーを使い、水200mLを計り、先の三角フラスコに入れる。
- (3) 三角フラスコにアルミホイルをする。次週オートクレーブで滅菌する。

質量パーセント濃度

【オートクレーブ】

- (1) 缶体のステンレス製の底板が水で浸る程度になっていることを確認する。
- (2) かごにアルミホイル (二重にして) や新聞紙で包んだ器具、水など滅菌するものを入れ、オートクレーブに納める。  
\*液体を滅菌するときは、三角フラスコなどに入れるが、液量は半分以下にする。  
また、耐熱・耐圧性のピンでなければ、密栓はしない。
- (3) しっかりと蓋をし、排水弁・排気弁が閉じていることを確認してから、温度・時間を設定する。(120°C, 20分程度)
- (4) タイマーが切れ、缶内の圧力がゼロになったことを確認してから、排気弁を開ける。  
排気弁から蒸気が出ないことを確認して、蓋を開ける。

実験日 年 月 日	年 組 番	氏 名	
	グループ番号 ( )		

## 生物探究ゼミ② 培養の基礎(2)

### 【目的】

今回は、クリーンベンチの使い方、無菌操作の基本を理解する。

### 【準備】

三角フラスコ、シャーレ、オートクレーブ、クリーンベンチ、コンラージ棒、

マイクロピペット、マイクロチューブ、寒天培地、エタノール、光学顕微鏡一式、乾燥酵母等

### 【方法、結果】

#### 1. クリーンベンチの使い方

- (1) 使用する30分～1時間くらい前に殺菌灯をつけておく。
- (2) 10分くらい前になったらドアを少し開けて、ファンを回しておく。
- (3) 殺菌灯を消し、使用直前に70%エタノールを壁面・床面・室内にスプレー散布する。  
あわせて、70%エタノールを脱脂綿などにつけ、内部を拭く。  
\*ドアを開ける高さは25cm以内にとどめる。  
\*手・指を70%エタノールで消毒して行う。  
\*作業中は殺菌灯を消灯しておく。
- (4) 使用後はドアを閉め、ファンを消して、殺菌灯をつける。1時間程度で消す。

#### 2. 寒天培地のシャーレへの分注（クリーンベンチ内）

- (1) 三角フラスコの口をバーナーであぶってから、シャーレに目分量で15～20mLずつ分注する。（室温によるが、数十分で固まる）→3枚つくる。  
\*炎のそばで操作し、シャーレの蓋を開ける時間は短くする。  
\*クリーンベンチ内での培養容器などの蓋の開閉は、培養容器の口を火炎で軽く焼いて殺菌してから行う。
- (2) 気泡が入った場合は、固まる前に、焼いた白金線・コンラージ棒で触って泡を消す。
- (3) 培地が固まったら、シャーレを裏にして置いておく。

#### 3. 生物材料の準備（バーナーの火炎の下側で行う）

- (1) 乾燥酵母0.1gを滅菌水100mLに入れ、攪拌する。（→酵母懸濁液）
- (2) (1)の懸濁液を元とし、よく攪拌してから、100 $\mu$ Lを計り取り、マイクロチューブに移す。
- (3) 次に、このマイクロチューブに水900 $\mu$ Lを入れ、元の10倍希釈液をつくる。
- (4) さらに、10倍希釈から(2),(3)の作業を続けて、100倍希釈液をつくる。
- (5) 100倍液から、もう一度(2),(3)の作業を続けて、1000倍希釈液をつくる。

#### 4. 植え付け（クリーンベンチ内）

- (1) マイクロチューブの中身をそれぞれ0.1mL(100 $\mu$ L)計り取り、シャーレにあける。
- (2) コンラージ棒を火炎滅菌し、寒天培地全体に広げる。  
\*火炎殺菌では、エタノールに引火した火が手元に来たりしないように、器具を下向きにする。
- (3) シャーレの裏にはフェルトペンで何のプレートが分かるように書いておく。
- (4) 恒温器内に移し、30℃で培養する。

【高校生の科学研究のための国際ルール】

不正行為は研究およびコンテストのいかなる段階においても禁止されている。不正行為には、盗作、偽造、他の研究者の成果を自分のものとして利用・発表すること、データの偽造・改ざんがこれに含まれる。不正をした研究は Intel ISEF および提携フェアへの参加資格を剥奪される。

動物を使わない研究方法を強く推奨し、動物を使う研究のためには代替手段を用いることを生徒に勧める。人体・脊椎動物・危険性のある生物及び生物由来の物質のいずれかを題材とした研究は、研究開始前に IRB（治験審査委員会）および SRC（科学審査委員会）による審査・承認を受けること。ルールブックの該当する章を参照のこと。

〔脊椎動物（ヒトを除く）を対象とした研究に関するルール〕

瞬間的な痛みを上回る苦痛を脊椎動物に与えたり、脊椎動物を故意に殺すことを計画した研究計画は禁止されている。

生徒が、脊椎動物を用いた以下のような研究を計画したり、まさに没頭したりすることは、禁止されている。

- a. 痛みや苦痛、死をもたらす可能性があると思われる有害物質（アルコール、酸性雨、農薬、重金属、その他を含む）を用いた毒性誘導研究
- b. 嫌悪刺激・母子分離・絶望感を誘発するといった条件を用いた行動実験
- c. 痛みの研究
- d. 捕食者・脊椎動物の被食者の実験

〔潜在的危険性のある生物由来物質を用いる全ての研究のルール〕

以下の研究については、SRC による事前審査は免除され、追加の書類提出は必要ない。

- a. パン酵母及び醸造用酵母を用いる研究。（ただし、組換え DNA を用いる研究は例外）
- b. 乳酸菌、窒素固定細菌、油や藻類を食べる細菌を自然な環境で用いる研究。（ただし、それらをペトリ皿で培養した場合は免除の対象とならない。）
- c. 水や土の研究で、増殖に関わる培地が濃縮されていないもの。（他に該当する個別のルールがないことを以下で確認すること）
- d. 食物に生えるカビの研究でカビが生えたと認められた段階で実験を終了させる場合
- e. キノコ類、粘菌を用いた研究
- f. 学校で行われ、組換え DNA 研究でない、大腸菌 k-12 を扱った研究

実験日 年 月 日	年 組 番	氏 名	
	グループ番号 (       )		

## 生物探究ゼミ③ 培養の基礎(3)

### 【目的】

培養手順について振り返り、培養の結果を観察する。また、結果から考察を広げていく。

### 【準備】

培養したシャーレ

### 【手順の振り返り】

①なぜ、シャーレを裏にして培養したのか。

### 【方法, 結果】

#### 1. 培養結果の観察

- (1) 培養酵母は、3日培養した後冷蔵庫で保存した。
- (2) ふたをしたまま、裏面側から酵母の様子を観察する。  
(培養中に観察するときは、この段階で終え、ふたはとらない)
- (3) ふたをとり、培地上にあるコロニーを観察する。  
コロニーとは・・・細菌1個体が増殖して、目に見えるようになった生物集団のこと。

特徴①

②

③

- (4) シャーレ内のコロニーの数を数える。  
→コロニーの数を簡単に推定するにはどうしたらいい? →  
<計算>

### <スケッチ>

(10倍希釈)

(100倍希釈)

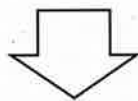
(1000倍希釈)

- (5) コロニーの数から、元の酵母懸濁液（希釈前） $1\ \mu\text{L}$ 中の酵母菌数を推定する。〈比例計算〉
- シャーレ  $100\ \mu\text{L}$  中 → コロニー（            ）個
- $1\ \mu\text{L}$  中 → コロニー（            ）個
- 1000 倍希釈しているのので
- 元の酵母懸濁液  $1\ \mu\text{L}$  中の酵母は、（            ）個 / コロニー数を基にした推定値

- (6) 血球計算盤を用いた酵母の  $1\ \mu\text{L}$  中の数と比較する。（1 週目の実習）
- 血球計算盤による測定  $1\ \mu\text{L}$  中に（            ）個
- コロニーによる推定値  $1\ \mu\text{L}$  中に（            ）個

酵母液  $1\ \mu\text{L}$  中の酵母の数が異なるのはなぜか？

<ヒント>コロニーとはどんなものだったかを考えてみる。



- (7) 酵母の生存率（%）を求めてみよう。

<式>

酵母の生存率（            ）%

実験日	年	年	組	番	氏名
月	日	グループ番号（            ）			

## 生物探究ゼミ③ 顕微鏡の使い方

### 【目的】

実体顕微鏡・光学顕微鏡の仕組みを理解し、  
基本的な顕微鏡に関する技術を習得する。

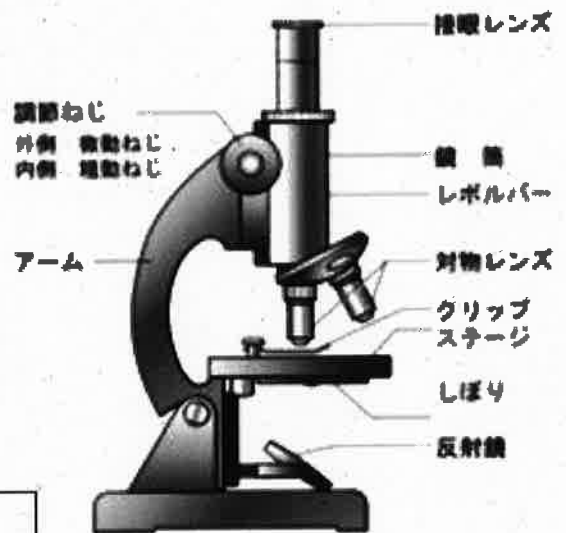
### 【準備】

実体顕微鏡、光学顕微鏡、検鏡用具、500円玉、

### 【光学顕微鏡の仕組み】

光学顕微鏡では、反射鏡や光源により光を下から試料  
にあて、その透過してきた光をレンズで拡大した像を観  
察している。(→透過光による観察)

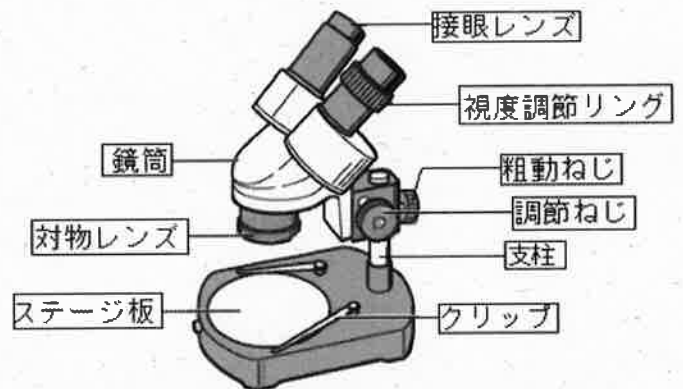
#### <見え方の特徴>



### 【実体顕微鏡の仕組み】

実体顕微鏡では、主に上から光を試料に  
あて、その反射してきた光をレンズで拡大  
した像を観察している。

(→反射光による観察)



### 【方法, 実習】

#### 1. 実体顕微鏡の基本的な操作

- (1) 接眼レンズの視度調節環（視度調節リング）を左右とも0にする。
- (2) 調節ねじ（焦準ハンドル）で鏡体を下に下げる。
- (3) 500円玉をステージに置き、まず自分の目の幅に合うように接眼レンズの幅を調節する。
- (4) 両目で接眼レンズをのぞき、調節ねじで鏡体を遠ざけながらピントを合わせる。  
(初めに低倍率で行うこと。)
- (5) 次に片方の目で接眼レンズをのぞき、ピントがずれた場合のみ、その接眼レンズの視度調節環で調整する。
- (6) 実物の500円玉に対して実体顕微鏡を通して見た像はどのように見えるか。

- (7) 実物を右上に動かしてみると像はどのように動くかを調べてみる。

- (8) 高倍率に変え観察し、普段気がつかないことを見つける。



### 生物探究ゼミ③ 顕微鏡で観察した試料の長さの測定

次回の生物探究ゼミ④では、顕微鏡で観察した試料の長さを測る実習をします。そこで、ものの長さを測るためには何が必要か。どうしたらよいかを考えてみよう。

(1)観察物の長さを測るためには何が必要。



- 接眼マイクロメーター
- 対物マイクロメーター

(2)それぞれのマイクロメーターのつくりを観察してみよう。

- 実体顕微鏡を用いて、それぞれのマイクロメーターを観察する。
- はじめに、低倍率で全体が見えるようにし、その後、拡大する。

(3)このマイクロメーターを、どのようにして使うか考えてみよう。

実際の観察では、片方のマイクロメーターだけを使って測定します。さて、どちらでしょう。理由もあわせて考えよう。

(            )マイクロメーター

<理由>

【連絡】次回、双目光学顕微鏡をつかった実技テストをします。操作法を確認しておこう。

実験日	年	年	組	番	氏名	
月	日	グループ番号 (            )				

## 生物探究ゼミ④ ミクロメーターの使用法と測定

### ① 対物ミクロメーターを用いた測定

【準備】 光学顕微鏡, 対物ミクロメーター, プレパラート

【実習】 対物ミクロメーターの上にプレパラートをのせて、10倍で観察してみよう。

【結果】



つまり、対物ミクロメーターでは、観察物の長さの測定はできない。

### ② 接眼ミクロメーターを用いた測定

【準備】 光学顕微鏡, 接眼ミクロメーター, プレパラート

【手順】 1. 接眼ミクロメーターのセット

(1) 接眼ミクロメーターをケースから取り出す。汚れている場合は、やわらかいガーゼなどできれいにふく。

(2) 接眼レンズの上のレンズを回して取り外し、接眼ミクロメーターを中に入れる。レンズをのぞいてミクロメーターの数字が正しく見えるか確かめる。

【実習】 対物レンズを、4倍、10倍、40倍と変えたとき、接眼ミクロメーターの目盛りはどうなったか。

【演習】 接眼ミクロメーターに見たてた目盛り付きのシャーレを使って考えてみよう。

・写真は、同じものを拡大したものです。メモリ付きのシャーレで、写真（ゾウリムシの短径）を測定してみよう。

結果



考察 同じものなのに、目盛りの値が異なるので、このままでは長さの測定ができない。

・・・1目盛りの長さが分からないから。

★ 顕微鏡で長さを測定するためには、接眼ミクロメーターの目盛りの長さが変化するため、**倍率ごとに、接眼ミクロメーター1目盛りの長さを確定する必要がある。**

<思考問題>

もとの写真を4倍拡大した。接眼ミクロメーターの1目盛りの長さは、どう変化する？

### ③ ミクロメーターの使用法

#### ・接眼ミクロメーター

接眼レンズの中に入れる目盛り板。実際の測定に用いる。

★注意点・・・倍率によって一目盛りの長さが変わる。

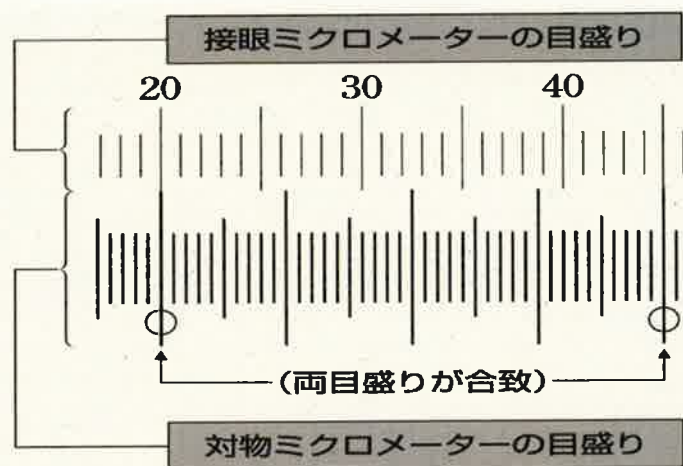
#### ・対物ミクロメーター

スライドガラス上に正確に1目盛り10 $\mu\text{m}$ の目盛りが刻まれたもの。

接眼ミクロメーターの1目盛りの長さを確定するため（基準となる）に用いる。

#### <使用方法>

- ① 顕微鏡の接眼レンズに接眼ミクロメーター、ステージに対物ミクロメーターをセットする。
- ② ピントをあわせ、両ミクロメーターの目盛りが一致している場所を2カ所探す。
- ③ 一致している間（2点間）の目盛り数を数える。
- ④ 対物ミクロメーターの1目盛りは、10 $\mu\text{m}$ である。対物ミクロメーターの2点間の目盛りの数から、実際の長さ（実寸）が計算できる。
- ⑤ 倍率ごとに変化する接眼ミクロメーターの1目盛りの値を、④の実際の長さより計算し、接眼ミクロメーターの1目盛り値を算出する。



$$\text{接眼ミクロメーターの1目盛りの長さ} (\mu\text{m}) = \frac{\text{対物ミクロメーターの目盛り数} \times 10\mu\text{m}}{\text{接眼ミクロメーターの目盛り数}}$$

(例) 上図では接眼ミクロメーター20と45の2点で一致。この間の目盛り数を数える。

→ 接眼ミクロメーター25目盛り 対物ミクロメーター40目盛り

$$\text{※ 接眼ミクロメーター1目盛りの長さ} = \frac{40 \times 10\mu\text{m} (\text{実寸})}{25} = 16\mu\text{m}$$

- ⑥ 対物ミクロメーターをはずし、観察したい試料をのせて接眼ミクロメーターで大きさ（長さ）を測定する。

④ 各倍率での接眼マイクロメーター1目盛りの長さの測定

【実習 ①】

- (1) 対物マイクロメーターをステージにセットし、最低倍率で目盛り線にピントを合わせる。
- (2) 資料③にしたがって、各倍率での接眼マイクロメーター1目盛りの長さの測定を行い、下の表を完成させる（単位を忘れないこと）。

接眼 レンズ	対物 レンズ	倍率	接眼マイクロメーター 1目盛りの長さ
( ) ×	4 ×	倍	
	10 ×	倍	
	40 ×	倍	

<考えてみよう> 観察対象が斜めになっている場合、どうやって測定したらよいか。

【実習 ②】 マイクロメーターを用いた測定 ……（顕微鏡テストを受けてない時間で）

- (1) 資料③の⑥に従って、対物マイクロメーターをはずし準備してあるプレパラートをステージ上へセットする。
- (2) 今回は、根の上部（分裂していない部分）の細胞の長径を観察する。
- (3) 接眼マイクロメーターの目盛りを数え、倍率ごとに上の表を参考に計算する。

接眼 レンズ	対物 レンズ	接眼マイクロメーターの 1目盛りの長さ （上の表）	接眼マイクロメーターの 目盛りの数	試料の実際の長さ （mm）
( ) ×	4 ×			
	10 ×			
	40 ×			

- (4) 時間がある人は、①細胞の短径、②核の直径、③染色体（根の先端部）の長さを観察してみよう。

- ①細胞の短径 ( )  $\mu\text{m}$   
 ②核の直径 ( )  $\mu\text{m}$   
 ③染色体（根の先端部）の長さ ( )  $\mu\text{m}$

顕微鏡テストで指摘された項目をメモしておこう。

--

### アンケート

- ①クラスルームに入る
- ②1年玉島探究Ⅰ R組に入る
- ③探究ゼミ修了後の-googleフォームが届いているので、それをクリック
- ④事後アンケートが開くので、回答する

実験日 月 日	年	年 組 番	氏 名	
		グループ番号 ( )		